

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie
Studijní obor: Chemie životního prostředí



Petra Kohoutová, DiS.

POROVNÁNÍ METOD PRO STANOVENÍ ASKORBOVÉ Kyseliny v léčivých přípravcích

The comparison of methods for determination of ascorbic acid
in medical formulations

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Vedoucí závěrečné práce: RNDr. Karel Nesměrák, Ph.D.

Praha 2011

Tato bakalářská práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného záměru MSM0021620857.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze 20. května 2011

.....
podpis

Poděkování

Děkuji RNDr. Karlu Nesměrákovi, Ph.D. za cenné rady, podněty a připomínky při zpracování bakalářské práce.

Abstrakt

Cílem této bakalářské práce bylo porovnat a zhodnotit vybrané analytické metody pro stanovení askorbové kyseliny v léčivých přípravcích z hlediska jejich správnosti, přesnosti, časové a finanční náročnosti. Ke stanovení byly vybrány čtyři metody: acidimetrická titrace s vizuální a instrumentální indikací, jodometrie a spektrofotometrie. Jako vzorky léčivých přípravků byly vybrány tablety, kapsle a injekční roztok. Z dosažených výsledků se co do správnosti s deklarovanou hodnotou (resp. povoleným rozmezím podle lékopisu) shodly všechny titrační metody, spektrofotometrická stanovení vykazovala nadhodnocené výsledky. Všechny použité metody byly zhruba stejně přesné. Jako časově nejvýhodnější se jeví acidobazická titrace s vizuální indikací, naopak nejnáročnější z hlediska času byla spektrofotometrie. Z hlediska finanční náročnosti se jako nejvýhodnější ukázalo stanovení titračními metodami, jejichž náklady byl srovnatelné.

Klíčová slova: askorbová kyselina, alkalimetrie, jodometrie, UV-spektrofotometrie

Abstract

The aim of this thesis is to compare and assess chosen analytical methods for ascorbic acid determination in pharmaceuticals with respect to their correctness, accuracy, time and finance exigencies. Four methods were chosen alkalimetric titration with visual and instrumental indication, iodometry and spectrophotometry. Pills, capsules and injection solution were chosen as samples of pharmaceuticals. The obtained results as to accuracy of the declared value (or range permitted under Pharmacopoeia) agreed by all titration methods, spectrophotometric determination showed overestimated results. All used methods were approximately equally accurate. As time seems to be most optimal acidobasic titration with visual indication, while demanding in terms of time was spectrophotometry. If we consider methods on financial intensity all titration methods were quite equal.

Key words: ascorbic acid, alkalimetry, iodometry, UV-spectrophotometry

Obsah

1	CÍL BAKALÁŘSKÉ PRÁCE	8
2	TEORETICKÁ ČÁST	9
2.1	Askorbová kyselina	9
2.2	Metody stanovení askorbové kyseliny	10
2.3	Principy vybraných stanovení askorbové kyseliny	11
2.3.1	Alkalimetrická titrace	11
2.3.2	Jodometrická titrace	12
2.3.3	Spektrofotometrické stanovení	13
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	15
3.1	Vzorky lékových forem	15
3.2	Použité chemikálie	15
3.3	Použité metody měření a zpracování dat	15
3.3.1	Alkalimetrická titrace s vizuální indikací	15
3.3.2	Alkalimetrická titrace s potenciometrickou indikací	16
3.3.3	Jodometrická titrace	17
3.3.4	Spektrofotometrické stanovení	18
3.4	Statistické zpracování naměřených dat	20
4	VÝSLEDKY A DISKUZE	21
4.1	Alkalimetrická titrace s vizuální indikací	21
4.2	Alkalimetrická titrace s potenciometrickou indikací	22
4.3	Jodometrická titrace	23
4.4	Spektrofotometrické stanovení	24
4.5	Vyhodnocení přesnosti, správnosti, časových a finančních nákladů jednotlivých stanovení	26
5	ZÁVĚR	29
	Literatura	30

Seznam použitých zkratek a symbolů

a	směrnice kalibrační přímky [$\text{ml } \mu\text{g}^{-1}$]
b	úsek kalibrační přímky
A	absorbance
c	molární koncentrace [mol dm^{-3}]
E°	standardní elektrodový potenciál [V]
f	faktor odměrného roztoku
l	délka absorbujícího prostředí [cm]
m	hmotnost [mg]
n	počet měření
M	molární hmotnost [g mol^{-1}]
pK_a	disociační konstanta kyseliny
pK_i	disociační konstanta indikátoru
R	korelační koeficient
s_r	relativní směrodatná odchylka
V	objem [ml]
w	obsah složky ve vzorku [hmotnostní %]
λ	vlnová délka [nm]
ε	molární absorpční koeficient [$\text{mol}^{-1}\text{dm}^3\text{cm}^{-1}$]

1 CÍL BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

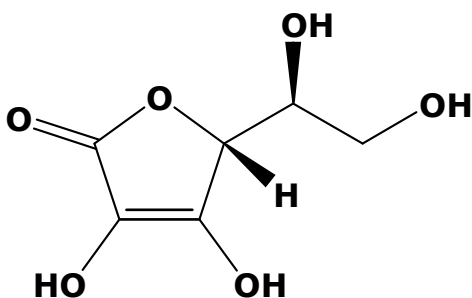
Cílem této bakalářské práce je porovnat a zhodnotit vybrané analytické metody (alkalimetrie, jodometrie a UV spektrofotometrie) pro stanovení askorbové kyseliny ve vybraných léčivých přípravcích (tabletách, kapslích a injekčním roztoku) z hlediska jejich správnosti, přesnosti, časové a finanční náročnosti.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Askorbová kyselina

Askorbová kyselina je sacharid s antioxidačními vlastnostmi, jejíž *L*-enantiomer je znám pod pojmem vitamin C a název je historicky odvozen od předpony „*a*“ vyjadřující zápor a slova „*scorbus*“, neboli kurděje. Askorbovou kyselinu ve formě čisté látky se podařilo izolovat z hovězí nadledvinkové kúry maďarskému biochemikovi Albertovi Szent-Györgyiovi roku 1927. O deset let později byl jeho objev oceněn Nobelovou cenou za medicínu a v tomtéž roce britský chemik Norman Haworth poprvé vyrobil askorbovou kyselinu synteticky [1].

Askorbová kyselina (obr. 2.1), systematicky 2,3-endiol γ -laktonu 2-oxo-*L*-gulonové kyseliny, je bílý nebo téměř bílý krystalický prášek snadno rozpustný ve vodě, dobře rozpustný v 96% lihu a prakticky nerozpustný v etheru. Působením vzduchu a vlhkosti mění barvu. Jeho sumární vzorec je $C_6H_8O_6$ a molární hmotnost $176,13 \text{ g mol}^{-1}$. Hydroxylové skupiny v enol-uspořádání jsou silně kyselé a molekula se chová jako jednosytná kyselina [2].



Obr 2.1 Chemická struktura askorbové kyseliny

Askorbová kyselina se přirozeně vyskytuje v rostlinách. Čerstvá zelenina, ovoce a citrusové plody jsou jejím hlavním zdrojem pro člověka. Pro většinu plazů, ptáků a savců však není askorbová kyselina vitaminem, neboť svou spotřebu této látky

dokáží pokrýt vlastní biosyntézou v ledvinách či játrech. Průmyslová výroba pro potravinářské účely vychází z D-glukosy, zahrnující několikastupňovou syntézu včetně transformace pomocí mikroorganismů.

Askorbová kyselina je silným redukčním činidlem a patří mezi biochemické reverzibilní oxidačně-redukční systémy [1, 3]. Působí většinou nepřímo jako specifický donor vodíku (zabraňuje např. oxidaci železnatých iontů na ionty železité v různých oxygenasach), zajišťuje správnou stavbu a funkci pojivových tkání a cévní stěny, činnost řady enzymů a metabolismus některých látek (např. cholesterolu). Snižuje toxicitu řady xenobiotik (sloučenin těžkých kovů, dusitanů a dusičnanů), potlačuje některé typy rakoviny a jako kofaktor se účastní řady důležitých reakcí, především hydroxylace prolinu vázaného v kolagenu. V neposlední řadě se podílí na zvýšení celkové odolnosti organismu a chrání před působením zevních škodlivin.

V organismu jsou uloženy minimální zásoby askorbové kyseliny, nadbytek se vylučuje močí [1, 4]. Těžký nedostatek (skorbut, avitaminóza C) je v současnosti poměrně vzácný, projevuje se poškozením kapilár a krvácením, zánětem dásní a v dětství dochází k poruše vývoje zubů i kostí. Mírnější formy avitaminózy se zpravidla objevují při sníženém příjmu ovoce a zeleniny, případně při nevyvážené stravě. Naopak velké dávky askorbové kyseliny mohou vést k tvorbě ledvinových kamenů, k okyselení moči a následnému zhoršení reabsorpce močové kyseliny v ledvinách. Vysoký obsah volné askorbové kyseliny ve střevě vede ke zhoršenému zásobování vitaminem B12. Na druhé straně však dlouhodobě vysoký příjem askorbové kyseliny vede k nastavení potřeby tohoto vitaminu v organismu na vyšší úroveň, což se při normalizaci příjmu askorbové kyseliny do obvyklého rozmezí projeví pouze jejím nedostatkem.

Askorbová kyselina je nejčastěji užívána jako léčivo či potravinový doplněk. Nejběžněji užívanými lékovými formami jsou tablety, šumivé tablety, žvýkací tablety, kapsle, kapsle s postupným uvolňováním a injekční roztok. Obsah askorbové kyseliny se v dávkových lékových formách nejčastěji pohybuje na hladinách 100, 250, 500 a 1000 mg této kyseliny.

2.2 Metody stanovení askorbové kyseliny

Ke stanovení obsahu askorbové kyseliny v léčivech, léčivých přípravcích či jiných přírodních vzorcích lze použít velké množství metod, jejichž počet neustále narůstá.

Přehled metod pro stanovení askorbové kyseliny založených na titracích (acido-bazických i oxidačně-redukčních), elektrochemických metodách, chemiluminiscenčních metodách, kinetických metodách, fluorimetrických metodách, chromatografických metodách podali v přehledném článku Arya a kol. [5]. Titíž autoři podali i přehled dostupných spektrofotometrických metod pro stanovení askorbové kyseliny [6]. Metody pro stanovení askorbové kyseliny spektrofotometricky, chemiluminiscenčně a fluorescenčně, sorpční spektroskopií a vizuálními metodami podali Zaporožec a Krusinskaja [7].

Lékopisnou metodou [2] stanovení askorbové kyseliny je jodometrie. V substanci požaduje lékopis nalezení obsahu mezi 99,0–100,5 %, obsah askorbové kyseliny v jejích lékových formách musí být mezi 85–115 % deklarovaného obsahu.

2.3 Principy vybraných stanovení askorbové kyseliny

V této bakalářské práci byly vybrány čtyři metody stanovení askorbové kyseliny, a to alkalimetrická titrace s vizuální a instrumentální indikací, jodometrická titrace a spektrofotometrické stanovení.

2.3.1 Alkalimetrická titrace

Acidobazické titrace, jinými slovy také neutralizační odměrná analýza, slouží ke stanovení obsahu vodíkových kationtů ve vzorku [8]. Podstatou stanovení je reakce mezi kyselinou a zásadou. Probíhá-li reakce ve vodném prostředí, jedná se o reakci hydroxoniových kationtů s hydroxidovými anionty za vzniku velmi málo disociovaných molekul vody



Při titraci například kyseliny zásadou (alkalimetrie) ubývají z roztoku postupně vodíkové ionty a v bodě ekvivalence dosáhne jejich koncentrace v roztoku hodnoty, jež je charakteristická pro roztok soli vzniklé reakcí obou zúčastněných složek. Maximální změna pH roztoku nastává právě v bodě ekvivalence, čehož se využívá k jeho určení. Grafická závislost změny pH na množství přidaného titračního činidla, udávajícího stupeň titrace, se nazývá titrační křivka, jejíž průběh je vždy esovitý, ale

tvár je rozdílný dle síly kyselin a zásad. Spolehlivost titrace je závislá na správném určení bodu ekvivalence. Nejjednodušší je indikace vizuálním indikátorem, což je látka přidávaná do titrovaného roztoku, jež vyvolává zřetelně viditelnou změnu titrovaného roztoku v bodě ekvivalence, případně v jeho těsné blízkosti. Uvedené změny jsou způsobeny změnou poměru koncentrací obou příslušných forem indikátoru (disociované a nedisociované). Subjektivní indikace vizuálními indikátory není vždy uspokojivá, a proto se uplatňují indikační metody instrumentální, zejména potenciometrie. Při potenciometrické indikaci acidobazické titrace se průběh titrace sleduje měřením rovnovážného napětí článku tvořeného indikační skleněnou elektrodou a běžnou referenční elektrodou (obvykle argentchloridovou). Potenciometr v takovém případě je obvykle kalibrován přímo v jednotkách pH.

Askorbová kyselina je jednosytnou kyselinou, podle hodnoty disociační konstanty ($pK_a = 4,17$) je řazena mezi slabé kyseliny. Může být tedy titrována s použitím odměrného roztoku silného hydroxidu, jako vizuálního indikátoru bude výhodné použít indikátoru s $pK_i \approx 8-9$, tedy například fenolftalein.

2.3.2 Jodometrická titrace

Jodometrie zahrnuje velkou skupinu odměrných stanovení, založených na vratné reakci mezi jodem jako oxidačním a jodidem jako redukčním činidlem [8]. Standardní oxidačně-redukční potenciál systému odpovídající reakci

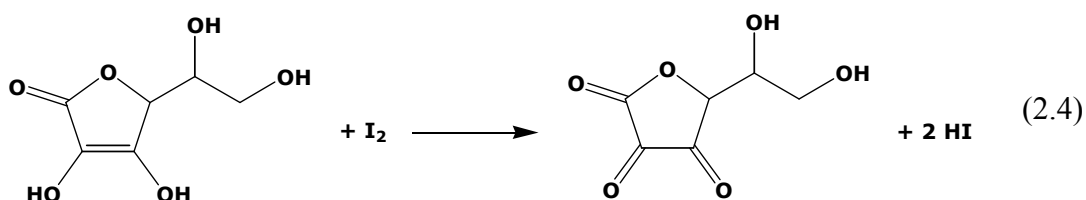


je udáván hodnotou $E^\circ(I_2/I^-) = 0,53 \text{ V}$. Směr reakce pak závisí na druhu přidávaného oxidačního nebo redukčního činidla a na reakčních podmínkách. Podle toho se někdy dělí tyto druhy odměrných stanovení na jodimetrii, kdy se činidlo s nižším redoxním potenciálem, než odpovídá výše uvedenému systému, oxidačně titrací odměrným roztokem jódu, a na jodometrii v pravém slova smyslu, kdy silnější oksyločovadla než jod jsou kvantitativně redukována v kyselém prostředí přebytkem přidaného jodidu draselného a ekvivalentní množství vyloučeného jódu se titruje odměrným roztokem thiosíranu (proto se také někdy jodometrie označuje jako thiosulfatometrie), jenž při tom přechází na tetrathionan



Odměrným roztokem jodu lze v kyselém prostředí přímo titrovat různé organické i anorganické analyty, které se jodem stechiometricky oxidují. Nepřímé jodometrické titrace se používá ke stanovení analytů, které lze stechiometricky oxidovat v alkalickém prostředí. V tomto případě se nechá reagovat nadbytek odměrného roztoku jodu se vzorkem v prostředí hydroxidu sodného, čímž dojde ke stechiometrické spotřebě jodu na oxidaci příslušného analytu. Poté se roztok okyslí a nespotřebovaný nadbytek jodu se ztitruje odměrným roztokem thiosíranu sodného. Oxidace jodidu draselného na jod v kyselém prostředí se využívá ke stanovení analytů s oxidačními vlastnostmi. Při tomto stanovení se nechá vzorek reagovat v kyselém prostředí s nadbytkem jodidu draselného, jenž je analytem stechiometricky oxidován na jod. Uvolněný jod se opět ztitruje odměrným roztokem thiosíranu sodného. Dosažení ekvivalence se při jodometrii indikuje škrobem (modré nebo hnědé zabarvení dle druhu použitého škrobu).

Askorbovou kyselinu lze v kyselém prostředí stechiometricky oxidovat jodem na dehydroaskorbovou kyselinu, podle rovnice



Tato přímá titrace je i lékopisnou metodou [2]. Před koncem titrace může tato redoxní reakce probíhat relativně pomalu, a proto je nutné v okolí bodu ekvivalence titrovaný roztok opatrně a důkladně promíchávat pro podporu reakce.

2.3.3 Spektrofotometrické stanovení

Spektrofotometrie v ultrafialové a viditelné (UV-VIS) oblasti se používá jako kvantitativní analytická metoda ke stanovení nejrozličnějších organických i anorganických látek [8]. Molekuly mají schopnost absorbovat elektromagnetické záření pouze určitých vlnových délek. Je to dáno tím, že mohou existovat v určitých kvantových stavech, které se liší obsahem energie. Vztah mezi velikostí

absorbovaného zářivého toku, tloušťkou absorbujícího prostředí a jeho koncentrací vyjadřuje Lambertův-Beerův zákon. Pro vlastní velikost absorpce vyjádřenou jako absorbance platí

$$A = \varepsilon c l \quad (2.5)$$

kde A je absorbance, ε je molární absorpční koeficient [$\text{mol}^{-1}\text{dm}^3\text{cm}^{-1}$], c je molární koncentrace [mol dm^{-3}] a l je délka absorbujícího prostředí [cm]. Platnost Lambert-Beerova zákona se ověřuje proměřením kalibrační křivky, kde se vynášejí hodnoty změřené absorbance proti koncentraci připravených roztoků.

Pro spektrofotometrické stanovení askorbové kyseliny byla navržena celá řada metod [5, 6]. V této bakalářské práci byla zvolena metoda podle Lau a kol. [9, 10] založená na katalytické oxidaci askorbové kyseliny komplexem Cu(II)-EDTA při vlnové délce 267 nm v prostředí octanu sodného (při $\text{pH} = 6$). Naměřená absorbance se koriguje odečtením absorbance samotného komplexu Cu(II)-EDTA. Metoda je vhodná pro obsah askorbové kyseliny ve vzorku v rozmezí 0–20 $\mu\text{g ml}^{-1}$, přesnost metody je podle autorů 0,1–0,5 %.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Vzorky lékových forem

Pro stanovení byly použity tři druhy lékových forem s obsahem askorbové kyseliny:

- 1) tablety Celaskon[®] 250 mg, výrobce Zentiva, ČR,
- 2) kapsle s postupným uvolňováním Cetebe[®] 500 mg, výrobce GlaxoSmithKline Consumer Healthcare, SRN,
- 3) injekční roztok ACIDUM ASCORBICUM Biotika 500 mg, výrobce HBM Pharma, SR.

3.2 Použité chemikálie

Všechny použité chemikálie byly analytické (nebo lékopisné) čistoty: askorbová kyselina (Lachema), dihydrát šťavelové kyseliny (Lachema), dihydrát edetanu sodného (Lachema), hydroxid sodný (Lachema), chlorid vápenatý (Penta), octová kyselina 99% (Lachema), kyselina sírová 96% (Lach-Ner), pentahydrát síranu měďnatého (Lachema), trihydrát octanu sodného (Lach-Ner).

3.3 Použité metody měření a zpracování dat

3.3.1 Alkalimetrická titrace s vizuální indikací

Příprava roztoků. Bezuhlíčitánový odměrný roztok hydroxidu sodného o koncentraci $0,5 \text{ mol dm}^{-3}$ byl připraven naředěním ze 46% zásobního roztoku hydroxidu sodného destilovanou vodou. Jeho přesná koncentrace byla stanovena titrací na dihydrát šťavelové kyseliny za vizuální indikace methylovou oranží. Titr takto připraveného odměrného roztoku byl 1,1072. Takto připravený odměrný roztok hydroxidu sodného byl použit jako titrační činidlo u obou typů alkalimetrických titrací.

Stanovení. Na analytických vahách byla zjištěna hmotnost vzorku lékové formy (tablety nebo tobolky), jenž byla následně rozetřena a zhomogenizována v třecí misce. Poté byla kvantitativně převedena do titrační baňky, naředěna asi 50 ml destilované vody, přidány 2 až 3 kapky fenolftaleinu. Obsah titrační baňky byl titrován z byřety objemu 10,00 ml odměrným roztokem hydroxidu sodného dokud jediná kapka titračního činidla nezměnila původně bezbarvé zabarvení na růžové.

Vyhodnocení. Výpočet obsahu askorbové kyseliny v analyzovaných vzorcích v procentech deklarovaného obsahu byl proveden podle následujícího vzorce

$$w_{\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6} = \frac{m_{\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6}}{m_{\text{dekl.}}} = \frac{c_{\text{NaOH}} V_{\text{NaOH}} f_{\text{NaOH}} M_{\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6}}{m_{\text{dekl.}}} \cdot 100 \quad (3.1)$$

kde $w_{\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6}$ je obsah askorbové kyseliny v analyzovaném vzorku v procentech deklarovaného obsahu [%], $m_{\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6}$ je hmotnost askorbové kyseliny ve vzorku [mg], $m_{\text{dekl.}}$ je hmotnostní obsah askorbové kyseliny deklarovaný výrobcem [mg], c_{NaOH} je koncentrace odměrného roztoku hydroxidu sodného [mol dm^{-3}], V_{NaOH} je objem spotřebovaného odměrného roztoku hydroxidu sodného v bodě ekvivalence [dm^{-3}], f_{NaOH} je faktor odměrného roztoku hydroxidu sodného a $M_{\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6}$ je molární hmotnost askorbové kyseliny [$176,124 \text{ g mol}^{-1}$].

3.3.2 Alkalimetrická titrace s potenciometrickou indikací

Stanovení. Postup stanovení byl shodný s postupem uvedeným v kap. 3.3.1, s výjimkou indikace, která byla instrumentální. K měření pH byl používán pH-metr firmy Jenway (model 3510) s kombinovanou skleněnou elektrodou téhož výrobce, měření mělo přesnost $\pm 0,02$ pH. Skleněná elektroda byla kalibrována komerčními pufrů firmy HANNA instruments o pH = 4,00, 7,00 a 10,00. Titrace probíhala v kádince objemu 250 ml za intenzivního míchání magnetickým míchadlem. Z naměřených hodnot byly sestrojeny titrační křivky, bod ekvivalence byl odečten pomocí první derivace.

Vyhodnocení. Výpočet obsahu askorbové kyseliny v analyzovaných vzorcích se provedl dle vzorce (3.1).

3.3.3 Jodometrická titrace

Příprava roztoků.

- 1) Odměrný roztok jodu o koncentraci $0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ byl převzat ze základního praktika analytické chemie PřF UK, kde byl připraven z chemikálií čistoty p.a. podle standardního postupu. Jeho faktor byl 0,9800.
- 2) Roztok kyseliny sírové byl připraven podle [2], kdy 13,75 ml 96% kyseliny sírové bylo doplněno do 250 ml destilovanou vodou.

Stanovení. Stanovení bylo provedeno podle postupu uvedeného v Českém lékopisu [2]. V případě tuhých lékových forem (tablety, tobolky) byla odvážená léková forma rozetřena a rozdělena na podíly (v případě tablet na dva, v případě tobolek na tři podíly) srovnatelné hmotnosti (důvodem byla spotřeba titračního činidla). Podíl zvážený na analytických vahách byl kvantitativně převeden do titrační baňky, bylo přidáno 10 ml roztoku kyseliny sírové a 1 ml roztoku škrobu jako indikátoru. Obsah titrační baňky byl titrován z byrety 100,00 ml odměrným roztokem jodu dokud jediná kapka titračního činidla nezměnila zabarvení indikátoru na hnědé.

V případě stanovení obsahu askorbové kyseliny v injekčním roztoku byl z obsahu ampulky odebrán alikvot 2,5 ml do titrační baňky, přidáno 10 ml roztoku kyseliny sírové, 1 ml roztoku škrobu jako indikátoru. Obsah titrační baňky byl titrován z byrety 50,00 ml odměrným roztokem jodu dokud jediná kapka titračního činidla nezměnila zabarvení indikátoru na hnědé.

Vyhodnocení. Výpočet obsahu askorbové kyseliny v analyzovaných vzorcích v procentech deklarovaného obsahu byl proveden podle následujícího vzorce

$$w_{\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6} = \frac{m_{\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6}}{m_{\text{dekl.}}} = \frac{c_{\text{I}_2} V_{\text{I}_2} f_{\text{I}_2} M_{\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6}}{m_{\text{dekl.}}} \cdot 100 \quad (3.2)$$

kde $w_{\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6}$ je obsah askorbové kyseliny v analyzovaném vzorku v procentech deklarovaného obsahu [%], $m_{\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6}$ je hmotnost askorbové kyseliny ve vzorku [mg], $m_{\text{dekl.}}$ je hmotnostní obsah askorbové kyseliny deklarovaný výrobcem [mg], c_{I_2} je koncentrace odměrného roztoku jodu [mol dm^{-3}], V_{I_2} je objem spotřebovaného odměrného roztoku jodu v bodě ekvivalence [dm^{-3}], f_{I_2} je faktor odměrného roztoku jodu a $M_{\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6}$ je molární hmotnost askorbové kyseliny [$176,124 \text{ g mol}^{-1}$].

3.3.4 Spektrofotometrické stanovení

Příprava roztoků.

- 1) Zásobní roztok askorbové kyseliny o koncentraci $1000 \mu\text{g ml}^{-1}$ byl připravován vždy čerstvým rozpuštěním 100 mg askorbové kyseliny v destilované vodě v odměrné baňce objemu 100 ml.
- 2) Roztok měďnatých kationtů o koncentraci $5 \mu\text{g ml}^{-1}$ a $\text{pH} = 6$ byl připraven odvážením 9,6 mg pentahydrátu síranu měďnatého, 13,61 g trihydrátu octanu sodného a jejich rozpuštěním v destilované vodě v odměrné baňce objemu 500 ml. Před doplněním baňky po rysku bylo ještě přidáno 0,2 ml 99% octové kyseliny.
- 3) Roztok EDTA o koncentraci $5 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ byl připraven odvážením 18,6 mg dihydrátu edetanu sodného a jeho rozpuštěním v destilované vodě v odměrné baňce objemu 100 ml.
- 4) Směsné činidlo Cu(II)-EDTA bylo připraveno smísením roztoku měďnatých kationtů a roztoku EDTA v poměru 4:1 těsně před jeho použitím.

Stanovení. Spektrofotometrické měření bylo prováděno na jednopaprskovém spektrofotometru HP 8453 s diodovým polem firmy Hewlett Packard s nanometrovým rozlišením od 190 nm do 1100 nm v kyvetách tloušťky 1 cm.

Nejprve byla sestrojena kalibrační přímka v rozsahu koncentrací askorbové kyseliny $0\text{--}20 \mu\text{g ml}^{-1}$. Kalibrační roztoky byly připraveny naředěním zásobního roztoku askorbové kyseliny, kdy do 5 ml odměrných baněk bylo pipetováno 10, 16, 25, 35, 50, 60, 75, 85 a 100 μl zásobního roztoku askorbové kyseliny, přidány 4 ml směsného činidla Cu(II)-EDTA, a obsah baněk byl doplněn destilovanou vodou

po rysku. Slepý vzorek byl připraven pipetováním 4 ml směsného činidla Cu(II)-EDTA do 5ml odměrné baňky a jejím doplněním po rysku destilovanou vodou. Byla proměřena absorbance takto připravených roztoků proti slepému vzorku při vlnové délce 267 nm.

Při stanovení obsahu askorbové kyseliny v tuhých lékových formách (tablety, kapsle) byl zváženy vzorek zhomogenizován v třecí misce a kvantitativně převeden do odměrné baňky (v případě tablet 250 ml, v případě kapslí 500 ml) a rozpuštěn v destilované vodě doplněním po rysku. K odstranění rušivého vlivu pomocných látek byl před spektrofotometrickým měřením roztok vzorku zfiltrován přes filtrační papír Filtrax 390. Do 5ml odměrné baňky bylo pipetováno 60 μ l filtrátu roztoku vzorku, přidáno 3,2 ml roztoku měďnatých kationtů. Po 15 minutovém stání při laboratorní teplotě bylo přidáno 0,8 ml roztoku EDTA a obsah baňky doplněn destilovanou vodou po rysku. Po proměření absorbance při 267 nm byla výsledná absorbance zaznamenána jako $A(II)$. Absorbance o níž je nutné snížit naměřenou absorbanci $A(II)$, neboli korekce na absorbanci komplexu Cu(II)-EDTA, byla naměřena tak, že do 5ml odměrné baňky bylo napipetováno 60 μ l filtrátu roztoku vzorku, přidáno 4 ml směsného činidla Cu(II)-EDTA a baňka byla doplněna destilovanou vodou po rysku. Absorbance změřená při 267 nm byla zaznamenána jako $A(I)$.

V případě stanovení obsahu askorbové kyseliny v injekčním roztoku byl z obsahu ampulky odebrán alikvot 1 ml a doplněn v odměrné baňce objemu 100 ml destilovanou vodou po rysku. Další postup stanovení byl shodný jako v případě tuhých lékových forem.

Vyhodnocení. Výpočet obsahu askorbové kyseliny v analyzovaných vzorcích v procentech deklarovaného obsahu byl proveden na základě získané rovnice kalibrační přímky podle následujícího vzorce

$$w_{\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6} = \frac{m_{\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6}}{m_{\text{dekl.}}} = \frac{V}{60} \cdot \frac{A(II) - A(I) - b}{a} \cdot 500 \quad (3.3)$$

kde $w_{\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6}$ je obsah askorbové kyseliny v analyzovaném vzorku v procentech deklarovaného obsahu [%], $m_{\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6}$ je hmotnost askorbové kyseliny ve vzorku [mg],

$m_{\text{dekl.}}$ je hmotnostní obsah askorbové kyseliny deklarovaný výrobcem [mg], V je objem v němž byl rozpuštěn analyzovaný vzorek [100, 250 nebo 500 ml], $A(\text{II})$ resp. $A(\text{I})$ jsou naměřené absorbance vzorku, b je úsek kalibrační přímky, a je směrnice kalibrační přímky [$\text{ml } \mu\text{g}^{-1}$].

3.4 Statistické zpracování naměřených dat

Všechna naměřená data byla zpracována běžnými statistickými postupy [11]. Odlehlost výsledků jednotlivých stanovení byla testována pomocí Deanova-Dixonova testu a výsledky měření jsou udány jako jednotlivé mediány s rozpětím a relativní směrodatnou odchylkou mediánu. Pro realizaci výpočtů a tvorbu grafů byly použity softwarové programy Microsoft Excel 2003 (Microsoft Corporation, USA) a OriginPro 7.0 (Microcal Software, USA).

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Alkalimetrická titrace s vizuální indikací

Alkalimetrické stanovení bylo možné provést pouze pro tuhé lékové formy (tablety a dražé), protože injekční forma obsahovala jako pomocnou látku hydrogenuhličitan sodný, který stanovení rušil. U každé lékové formy bylo provedeno pět alkalimetrických stanovení askorbové kyseliny s vizuální indikací konce titrace. Spotřeby odměrného roztoku hydroxidu sodného, odpovídající hmotnosti askorbové kyseliny a vypočítaný obsah askorbové kyseliny ve vzorku v procentech deklarovaného obsahu jsou uvedeny v tab. 4.1. Podle Deanova-Dixonova testu nebyl žádný výsledek vyloučen jako odlehlý.

Ve zkoumaném vzorku tablety Celaskon[®] byl obsah askorbové kyseliny v procentech deklarovaného obsahu stanoven na $103,35 \% \pm 1,99 \%$ ($s_r = 1,62 \%$) a v kapslích Cetebe[®] na $99,94 \% \pm 0,70 \%$ ($s_r = 0,47 \%$).

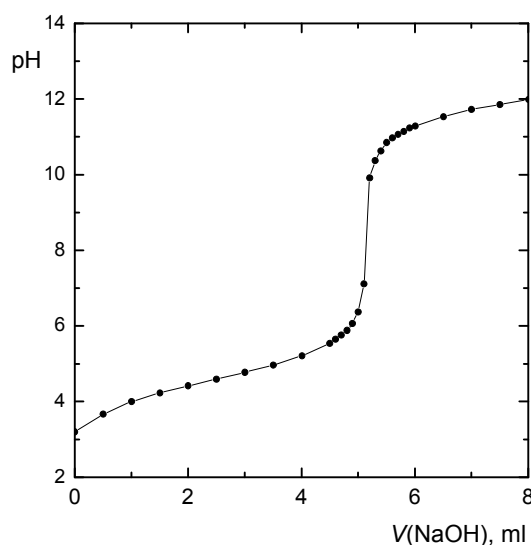
Tab. 4.1 Výsledky alkalimetrického stanovení askorbové kyseliny v lékových formách s vizuální indikací bodu ekvivalence. Spotřeby odměrného roztoku hydroxidu sodného, odpovídající hmotnosti askorbové kyseliny a vypočítaný obsah askorbové kyseliny ve vzorku v procentech deklarovaného obsahu.

typ vzorku deklarovaný obsah	stanovení	V_{NaOH} [ml]	$m(\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6)$ [mg]	$w(\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6)$ [%]
Celaskon [®] 250 mg	1	2,65	258,38	103,35
	2	2,65	258,38	103,35
	3	2,70	263,25	105,30
	4	2,70	263,25	105,30
	5	2,60	253,50	101,40
Cetebe [®] 500 mg	1	5,10	497,25	99,45
	2	5,00	487,50	97,50
	3	5,10	497,25	99,45
	4	5,15	502,13	100,43
	5	5,15	502,13	100,43

4.2 Alkalimetrická titrace s potenciometrickou indikací

Alkalimetrické titrace s potenciometrickou indikací byla provedena pouze pro tuhé lékové formy. Na obr. 4.1 je pro ilustraci uvedena naměřená titrační křivka alkalimetrického stanovení obsahu askorbové kyseliny v kapslích Cetebe[®]. Spotřeby odměrného roztoku hydroxidu sodného, odpovídající hmotnosti askorbové kyseliny a vypočítaný obsah askorbové kyseliny ve vzorku v procentech deklarovaného obsahu jsou uvedeny v tab. 4.2. Podle Deanova-Dixonova testu nebyl žádný výsledek vyloučen jako odlehlý.

Ve zkoumaném vzorku tablety Celaskon[®] byl obsah askorbové kyseliny v procentech deklarovaného obsahu stanoven na $101,40 \% \pm 3,98 \%$ ($s_r = 3,31 \%$) a v kapslích Cetebe[®] na $101,40 \% \pm 1,99 \%$ ($s_r = 1,65 \%$).



Obr. 4.1 Titrační křivka alkalimetrického stanovení obsahu askorbové kyseliny v kapslích Cetebe[®], titrace obsahu jedné kapsle odměrným roztokem hydroxidu sodného o koncentraci $0,5 \text{ mol dm}^{-3}$.

Tab. 4.2 Výsledky alkalimetrického stanovení askorbové kyseliny v lékových formách s potenciometrickou indikací bodu ekvivalence. Spotřeby odměrného roztoku hydroxidu sodného, odpovídající hmotnosti askorbové kyseliny a vypočítaný obsah askorbové kyseliny ve vzorku v procentech deklarovaného obsahu.

typ vzorku deklarovaný obsah	stanovení	V_{NaOH} [ml]	$m(\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6)$ [mg]	$w(\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6)$ [%]
Celaskon® 250 mg	1	2,50	243,75	97,50
	2	2,70	263,25	105,30
	3	2,50	243,75	97,50
	4	2,60	253,50	101,40
	5	2,60	253,50	101,40
Cetebe® 500 mg	1	5,30	516,75	103,35
	2	5,20	507,00	101,40
	3	5,30	516,75	103,35
	4	5,10	497,25	99,45
	5	5,20	507,00	101,40

4.3 Jodometrické stanovení

Jodometrické stanovení bylo provedeno pro všechny tři druhy analyzovaných lékových forem askorbové kyseliny. Spotřeby odměrného roztoku jodu, odpovídající hmotnosti askorbové kyseliny a vypočítaný obsah askorbové kyseliny ve vzorku v procentech deklarovaného obsahu jsou uvedeny v tab. 4.3. Podle Deanova-Dixonova testu nebyl žádný výsledek vyloučen jako odlehlý.

Ve zkoumaném vzorku tablety Celaskon® byl obsah askorbové kyseliny v procentech deklarovaného obsahu stanoven na $85,59 \% \pm 1,44 \%$ ($s_r = 1,66 \%$), v kapslích Cetebe® na $90,63 \% \pm 1,31 \%$ ($s_r = 1,43 \%$) a v injekčním roztoku ACIDUM ASCORBICUM Biotika na $100,83 \% \pm 0,30 \%$ ($s_r = 0,30 \%$).

Tab. 4.3 Výsledky jodometrického stanovení askorbové kyseliny v lékových formách. Spotřeby odměrného roztoku jodu, odpovídající hmotnosti askorbové kyseliny a vypočítaný obsah askorbové kyseliny ve vzorku v procentech deklarovaného obsahu.

typ vzorku deklarovaný obsah	stanovení	$V(I_2)$ [ml]	$m(C_6H_8O_6)$ [mg]	$w(C_6H_8O_6)$ [%]
Celaskon® 250 mg	1	25,44	219,54	87,82
	2	24,80	214,02	85,61
	3	24,41	210,66	84,26
	4	24,79	213,93	85,57
	5	24,63	212,55	85,02
	6	24,90	214,88	85,95
Cetebe® 500 mg	1	53,60	462,56	92,51
	2	51,70	446,16	89,23
	3	52,44	452,55	90,51
	4	52,58	453,76	90,75
	5	52,44	452,55	90,51
	6	53,58	462,39	92,48
ACIDUM ASCORBICUM Biotika 500 mg	1	58,42	504,16	100,82
	2	58,28	502,95	100,58
	3	58,43	504,24	100,85
	4	58,38	503,81	100,76
	5	56,59	488,36	97,67
	6	58,72	506,75	101,35

4.4 Spektrofotometrické stanovení

Byla naměřena kalibrační přímka pro spektrofotometrické stanovení askorbové kyseliny a získána následující kalibrační rovnice

$$A = 0,081 c [\mu\text{g ml}^{-1}] - 0,243 \quad (4.1)$$

$R = 0,9985$, $s_{x/y} = 0,161$, $n = 7$

Spektrofotometrické stanovení bylo provedeno pro všechny tři druhy analyzovaných lékových forem askorbové kyseliny. Naměřené absorbance, odpovídající hmotnosti askorbové kyseliny a vypočítaný obsah askorbové kyseliny ve vzorku v procentech

deklarovaného obsahu jsou uvedeny v tab. 4.4. Podle Deanova-Dixonova testu nebyl žádný výsledek vyloučen jako odlehlý.

Ve zkoumaném vzorku tablety Celaskon[®] byl obsah askorbové kyseliny v procentech deklarovaného obsahu stanoven na 118,19 % \pm 0,99 % ($s_r = 1,09$ %), v kapslích Cetebe[®] na 120,43 % \pm 2,22 % ($s_r = 2,23$ %) a v injekčním roztoku ACIDUM ASCORBICUM Biotika na 132,08 % \pm 2,12 % ($s_r = 2,23$ %).

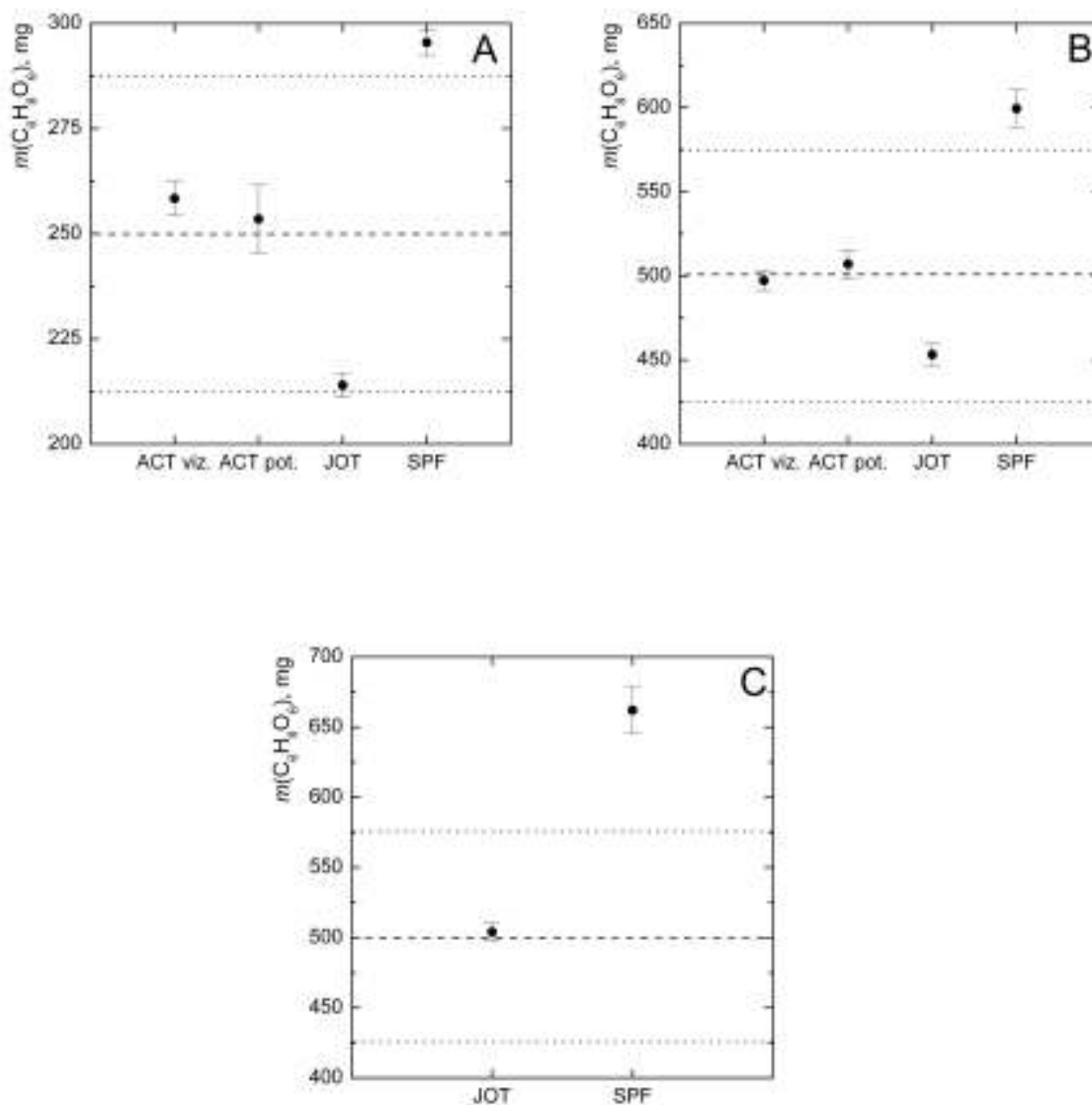
Tab. 4.4 Výsledky spektrofotometrického stanovení askorbové kyseliny v lékových formách. Naměřené absorbance, odpovídající hmotnosti askorbové kyseliny a vypočítaný obsah askorbové kyseliny ve vzorku v procentech deklarovaného obsahu.

typ vzorku deklarovaný obsah	stanovení	$A(I)$	$A(I)$	$m(C_6H_8O_6)$ [mg]	$w(C_6H_8O_6)$ [%]
Celaskon [®] 250 mg	1	0,911	0,000	295,65	118,26
	2	0,922	0,002	298,05	119,22
	3	0,920	0,010	295,48	118,19
	4	0,909	0,007	293,36	117,34
	5	0,908	0,006	293,29	117,32
	6	0,921	0,004	297,24	118,90
	7	0,946	0,013	301,47	120,59
	8	0,906	0,010	291,92	116,77
	9	0,906	0,000	294,49	117,80
Cetebe [®] 500 mg	1	0,958	0,014	608,59	121,72
	2	0,991	0,022	621,09	124,22
	3	0,957	0,011	609,74	121,95
	4	0,917	0,002	593,09	118,62
	5	0,915	0,017	584,72	116,94
	6	0,931	0,005	599,39	119,88
	7	0,939	0,014	598,59	119,72
ACIDUM ASCORBICUM Biotika 500 mg	1	0,980	0,002	625,67	125,13
	2	0,995	0,002	633,47	126,69
	3	1,057	0,005	663,46	132,69
	4	1,043	0,001	658,45	131,69
	5	1,056	0,001	665,22	133,04
	6	1,066	0,002	669,58	133,92
	7	1,024	0,026	635,77	127,15
	8	1,062	0,001	668,14	133,63
	9	1,051	0,002	662,08	132,42

4.5 Vyhodnocení správnosti, přesnosti, časových a finančních nákladů jednotlivých stanovení

Vzhledem k tomu, že v analyzovaných lékových formách není přesně definovaný obsah askorbové kyseliny (podle lékopisu [2] se může pohybovat v rozmezí 85–115 %), byla správnost stanovení jednotlivými použitými metodami porovnána pouze graficky pro příslušné lékové formy (obr. 4.3, na další straně). Z obrázku je patrné, že výsledky spektrofotometrického stanovení ležely mimo povolené rozmezí, výsledky tedy nebyly správné. Jodometrické stanovení v tuhých lékových formách poskytlo nižší hodnoty množství askorbové kyseliny ve vzorcích než acidobazická titrace. Na druhou stranu při stanovení v injekčním roztoku, kdy nemůže být uplatněna acidobazická titrace (vzhledem k přítomným interferentům) poskytla jodometrie velmi správné výsledky.

Přesnost jednotlivých použitých metod může být porovnána na základě směrodatné odchylky příslušného stanovení, ta je ale pro většinu použitých metod prakticky stejná.



Obr. 4.2 Porovnání výsledků stanovení jednotlivými metodami (ACT viz. – alkalimetrická titrace s vizuální indikací, ACT pot. – alkalimetrická titrace s potenciometrickou indikací, JOT – jodometrie, SPF – spektrofotometrie) pro vybrané druhy lékových forem s obsahem askorbové kyseliny (A) tablety Celaskon® 250 mg, (B) kapsle s postupným uvolňováním Cetebe® 500 mg, (C) injekční roztok ACIDUM ASCORBICUM Biotika 500 mg. Výsledky jsou udány jako mediány nalezených množství askorbové kyseliny s vyznačením směrodatných odchylek, čárkovaná čára vyznačuje deklarovaný obsah askorbové kyseliny, čerchovaná čára pak horní a dolní limit obsahu askorbové kyseliny podle Českého lékopisu 2009.

Časová náročnost jednotlivých metod byla vyhodnocena jako průměrný čas potřebný k provedení celé analýzy jednoho typu vzorku (od navážky vzorku až po vlastní výpočet procentuálního obsahu). Čas potřebný pro přípravu pomocných nebo odměrných roztoků, standardizaci roztoku a přípravu kalibrační přímky nebyl zahrnut. Časová náročnost tedy udává prakticky čistý čas potřebný pro analýzu jednoho vzorku. Zjištěná časová náročnost použitých metod je uvedena v tab. 4.5. Jako časově nejvýhodnější se ukazují titrační stanovení, naopak nejnáročnější z hlediska času byla spektrofotometrie vzhledem ke způsobu měření.

Tab. 4.5 Časová náročnost jednotlivých vybraných stanovení askorbové kyseliny v lékových formách.

metoda	časová náročnost
	[min]
acidobazická titrace s vizuální indikací	7,0
acidobazická titrace s potenciometrickou indikací	12,5
jodometrická titrace	8,5
spektrofotometrie	54,0

Finanční náročnost jednotlivých metod byla vyhodnocena jako finanční náklady na chemikálie potřebné ke stanovení jednoho vzorku. Pořizovací cena jednotlivých vzorků pro měření a náklady na pořízení přístrojů nebyly zahrnuty do finanční náročnosti. Ceny chemikálií byly převzaty z katalogů dodavatelských firem [12, 13]. Průměrná cena titračního stanovení byla asi 50 Kč, u spektrofotometrie asi 75 Kč (pro praxi je taktéž nutné vzít v úvahu vysoké pořizovací náklady na použitý přístroj).

5 ZÁVĚR

Předkládaná bakalářská práce se zaměřila na stanovení askorbové kyseliny ve vybraných léčivých přípravcích třemi titračními a jednou spektrofotometrickou metodou a následné porovnání správnosti, přesnosti, časové a finanční časové náročnosti jednotlivých metod.

Stanovení bylo provedeno čtyřmi metodami: alkalimetrickou titrací s vizuální a potenciometrickou indikací, jodometricky a spektrofotometricky. Z dosažených výsledků se co do správnosti s deklarovanou hodnotou (resp. povoleným rozmezím podle lékopisu) shodly všechny titrační metody, spektrofotometrická stanovení vykazovala nadhodnocené výsledky (možným vysvětlením je buď hrubá chyba v kalibraci nebo přítomnost pomocných látek v lékových formách, které stanovení ruší).

Z hlediska přesnosti na základě směrodatné odchylky příslušného stanovení jsou všechny použité metody zhruba stejně přesné.

Ze zhodnocení časové náročnosti jednotlivých stanovení se jako časově nejvýhodnější jeví acidobazická titrace s vizuální indikací, naopak nejnáročnější z hlediska času byla spektrofotometrie.

Z hlediska finanční náročnosti se jako nejvýhodnější ukázalo stanovení titračními metodami jejichž náklady byly srovnatelné. Dražší je stanovení spektrofotometrické.

LITERATURA

- [1] *Handbook of Vitamins*. R. B. Rucker, J. W. Suttie, D. B. McCormic, L. J. Machlin (Edits). 3rd Edition. New York, Marcel Dekker 2001, p. 529–554.
- [2] *Český lékopis 2009*. Praha, Grada 2009.
- [3] Hampl, F., Paleček, J.: *Farmakochemie*. Praha, VŠCHT 2002.
- [4] Vokurka, M. et al.: *Velký lékařský slovník*. 8. vyd. Praha, Maxdorf 2008.
- [5] Arya, S. P., Mahajan, M., Jain, P.: Non-spectrophotometric methods for determination of vitamin C. *Analytica Chimica Acta* **417**, 1–14 (2000).
- [6] Arya, S. P., Mahajan, M., Jain, P.: Photometric methods for the determination of vitamin C. *Analytical Sciences* **14**, 889–894 (1998).
- [7] Zaporozhets, O. A., Krushinskaya, E. A.: Determination of ascorbic acid by molecular spectroscopic techniques. *Journal of Analytical Chemistry* **57**, 343–354 (2002).
- [8] Zýka, J. et al.: *Analytická příručka*. 3. vyd. Praha, SNTL 1980.
- [9] Lau O. W., Luk, S. F., Wong K. S.: Background correction method for the determination of ascorbic acid in soft drinks, fruit juices, and cordials using direct ultraviolet spectrophotometry. *Analyst* **111**, 665–670 (1986).
- [10] Lau O. W., Luk, S. F., Wong K. S.: Determination of ascorbic acid in pharmaceuticals using direct ultraviolet spectrophotometry. *Analyst* **112**, 1023–1025 (1987).
- [11] Miller, J. N., Miller, J.C.: *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*. 5th edition Harlow, Pearson Education 2005.
- [12] <http://www.verkon.cz/> (citováno: 3. 5. 2011)
- [13] <http://www.thermofisher.cz/> (citováno: 3. 5. 2011)